Untersuchungen über das Cytochrom c des Karpfens

von

Lutz Gürtler

aus

Bielefeld

1969 Nr 200

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554222_0055

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Universität Erlangen-Nürnberg
Vorstand: Professor Dr. med. W. Kersten

Untersuchungen über das Cytochrom c des Karpfens

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Lutz Gürtler
aus
Bielefeld

Gedruckt mit der Erlaubnis der Medizinischen Fakultät

der Universität Erlangen-Nürnberg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. Kröncke

Referent: Doz. Dr. Horstmann

Correferent: Professor Dr. Kersten

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Februar 1969

Untersuchungen über das Cytochrom c des Karpfens

Das Haemoproteid Cytochrom c ist ein Glied der Atmungskette, jenes Stoffwechselweges, der bei allen aerob lebenden Organismen für die Endoxydation des substratgebundenen Wasserstoffs verantwortlich ist. Die rote Farbe des Proteins wird durch die Haemgruppe hervorgerufen, die über zwei Thioätherbrücken kovalent mit der Polypeptidkette verbunden ist. Bei den bisher untersuchten Arten bestand diese Polypeptidkette aus 103 bis 109 Aminosäuren.

Cytochrom c gehört zu den homologen Proteinen. Homolog heißt, daß die Proteinkette von einem Gen codiert wird, welches in allen Spezies vorkommt und das, irgendwann einmal aus einem gemeinsamen "Urgen" hervorgegangen, sich in dem Auseinanderstreben der Phylogenese unabhängig weiterentwickelte.

Durch Vergleich vieler homologer Proteine ist es möglich, einen Teil der geschichtlichen Entwicklung jener Organismen zu übersehen, die solche Proteine aufgebaut haben, sobald man deren Primärstruktur kennt. Durch derartige Untersuchungen lassen sich weiterhin Aussagen machen über die Wirkung von Mutationen, über den Aufbau des genetischen Codes und über die Ablesung der Desoxyribonucleinsäuren bei der Proteinsynthese.

Schließlich lassen sich bei Kenntnis vieler homologer Proteine diejenigen Aminosäuren in der Struktur des Moleküls bestimmen, die konstant bleiben, und die deshalb für die Aufrechterhaltung der Funktion dieser Proteine von überragender Bedeutung sein müssen (1).

Der erste Versuch, Cytochrom c zu isolieren, wurde 1887 von MacMunn unternommen (2). Margoliash und Smith (3) sowie Kreil und Tuppy (4) gelang es 1961 erstmalig, die Aminosäuresequenz von Pferdecytochrom c aufzustellen. Wegen der einfachen Materialbeschaffung wurde in der Folgezeit vorwiegend das Cytochrom c der Wirbeltiere analysiert.

Heute ist die Aminosäuresequenz von 10 Säugern bekannt (Mensch, Affe, Rind, Schwein, Schaf, Wal, Hund, Kaninchen, Pferd und Känguruh), von Huhn, von 2 Reptilien (Klapperschlange und Schildkröte Chelydra), von einem Knochenfisch (Thunfisch) und einem Knorpelfisch (Haifisch), von einem Insekt (Motte), von 4 Ascomyceten (davon 3 Hefearten), von einem Bakterium (Pseudomonas) und von einer Pflanze (Weizen). (Zusammenfassende Literatur: 1, 5, 6).

Von den Fischen wurde 1954 das Cytochrom c des Lachses (7) dargestellt, 1958 das von Bonito und Thunfisch (8), 1966 das des pazifischen Neunauges (9) und 1967 das des Haifisches (10).

Die Aminosäuresequenzen von Cytochrom c von Thunfisch (11) und Haifisch (10) sind bekannt. Das Cytochrom c des Karpfens (Cyprinus carpio) wurde gewählt, da sich erst durch den Vergleich mehrerer Primärstrukturen Rückschlüsse über die Evolution der Fische ziehen lassen.

In der Arbeit werden folgende Abkürzungen verwendet:

Ala	= Alanin	Met	= Methionin
Asp	= Asparaginsäure	Phe	= Phenylalanin
$AspNH_2$	= Asparagin	Pro	= Prolin
Arg	= Arginin	Ser	= Serin
Cys	= Cystein	Thr	= Threonin
Glu	= Glutaminsäure	Trp	= Tryptophan
$GluNH_2$	= Glutamin	Tyr	= Tyrosin
Gly	= Glycin	Val	= Valin
His	= Histidin	Asx	= Asparaginsäure oder Asparagin
Ile	= Isoleucin		
Leu	= Leucin	Glx	= Glutaminsäure oder Glutamin
Lys	= Lysin		

DANS = Dimethylamino-naphtalin-5-sulfonyl

MATERIAL UND METHODEN

Cytochrom c wurde aus 9800 Karpfenherzen, ca. 9,5 kg, gewonnen. Die Herzen der frisch geschlachteten Speisekarpfen wurden vom Vorhof befreit, gewaschen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -18° C aufbewahrt.

Die Darstellung des Cytochroms erfolgte im wesentlichen nach dem von Flatmark für das Rindercytochrom c angegebenen Verfahren (12) durch Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration. Daran anschließend wurde zur weiteren Reinigung mit Ammoniumsulfat ausgesalzt (13).

Bestimmungsmethoden

Spektrophotometrische Untersuchung

Die Absorptionskurven des mit Natriumdithionit reduzierten und mit Kalium-Ferricyanid oxydierten Cytochroms c wurden mit einem registrierenden Spektralphotometer (Beckman DK 2) geschrieben oder im Spektralphotometer (Zeiss M_4 Q II) gemessen. Für die Bestimmungen wurde das Cytochrom c in 0,065 M Na-Phosphatpuffer von pH 6,8 gelöst (12). Zur Berechnung der Reinheit des Präparates wurden die Extinktionen bei den Wellenlängen 280 nm (für das oxydierte Cytochrom) und 550 nm (für die reduzierte Form) bestimmt. Der Quotient aus diesen Extinktionen $E_{550\ red}/E_{280\ ox}$ (12) gestattet eine Aussage über den Grad der Verunreinigung des Cytochroms durch Fremdproteine, da diese einen Anstieg der Extinktionen bei der Wellenlänge 280 nm bedingen.

Die Bestimmung des Eisengehaltes wurde nach der Methode von Lorber (14) in der Modifikation von Paul (15) mit Sulfosalicylsäure durchgeführt.

Elektrophorese in Polyacrylamidgel

Das Gelbett (5 x 18 x 0,8 cm) bestand aus 14 % Polyacrylamidgel (16). Mit cytochrom-c-haltiger Lösung getränktes Sephadex G 50 (Pharmacia, Upsala) wurde anodennah in eine Grube des Gels eingefüllt.

Das Protein wanderte in 0,065 M Na-phosphatpuffer bei einem Spannungsgefälle von 1,5 Volt/cm Gel in 10 - 17 Stunden 3 - 5 cm weit. Da zwei Zonen auftraten, wurde das Gelbett unterteilt. In Puffer gequollenes Sephadex G 50 wurde durch Absaugen auf einer Fritte vom Pufferüberschuß befreit und 2 cm vom Start entfernt als 2 cm breite Zone eingebracht. Zur Rückgewinnung des elektrophoretisch getrennten Cytochroms wurde die Elektrophorese solange fortgesetzt, bis die an ihrer Farbe erkennbare Proteinzone in den mit Sephadex gefüllten Graben eingewandert war. Danach wurde das Sephadex-Bett ausgehoben und das Protein eluiert.

Enzymatischer Abbau des Cytochroms c

Zur Gewinnung der tryptischen Peptide wurden 10 mg Cytochrom c und 0,1 mg Trypsin (Serva, Heidelberg, 2 x kristallisiert) in 1 ml 0,1 M $(NH_4)_2CO_3$-Lösung 2,5 und 3,5 Std. lang bei 38° C inkubiert (17, 18). Das Ammoniumcarbonat wurde im Vakuum über NaOH und konz. H_2SO_4 weitgehend entfernt. In einem weiteren Ansatz wurde das verwendete Trypsin vorher mit 0,06 n HCl inkubiert, um die im Präparat noch vorhandene chymotryptische Aktivität herabzusetzen (19).

Zur Bestimmung der C-terminalen Aminosäuren wurde mit Alkohol denaturiertes Cytochrom c (20) im Gewichtsverhältnis 20 : 1 mit Carboxypeptidase A (Serva, Heidelberg 3 x krist., mit Diisopropylfluorphosphat behandelt) versetzt und in 0,1 % Na_2CO_3 (21) (0,2 ml pro 1 mg Cytochrom c) bei 38° C inkubiert. Im Abstand von 30 min. wurden 10 µl-Proben entnommen und durch Dünnschichtchromatographie analysiert.

Zur chymotryptischen Spaltung des Haemopeptids wurden 0,03 mg Material mit 0,075 mg Chymotrypsin (Serva, Heidelberg, 3 x krist.) in 0,5 ml 0,1 M$(NH_4)_2CO_3$ gelöst und 3 Std. bei 37° C bebrütet.

Analyse der Peptide

Zur Trennung der Peptide im Fingerprint-Verfahren wurden mit Kieselgel-Stärke (Machery, Nagel & Co.) beschichtete Dünnschichtplatten (40 x 20 cm) verwendet. Die vierstündige Elektrophorese (Pherograph "Original Frankfurt", Hormuth & Vetter, Temperatur -5° C) wurde in Längsrichtung im System Pyridin/Eisessig/Wasser = 10 : 1,5 : 88,5 (pH 6,0) (17) bzw. 10 : 2 : 88 (pH 5,8) bei 1100 Volt, 18 mA. durchgeführt. Die chromatographische Trennung erfolgte durch dreimaliges Aufsteigen im System Pyridin/nButanol/Eisessig/Wasser = 40 : 68 : 14 : 25 (17). Zwischen den Läufen wurden die Platten im kalten Luftstrom und anschließend 15 min. bei 80° C getrocknet.

Zur Markierung der Peptide wurden die Platten mit 0,7 - - 1,0 ml Ninhydrinlösung gleichmäßig besprüht (Zusammensetzung der Ninhydrinlösung: 10 ml Wasser, 5 ml Eisessig, 100 ml Aceton und 0,5 g Ninhydrin) (22). Die hierdurch erhaltene Färbung reicht einerseits aus, um Peptide erkennen zu können, verhindert aber andererseits eine vollständige Zerstörung der N-terminalen Aminosäure durch Reaktion mit dem Ninhydrin (23).

Histidin-, tyrosin- und tryptophanhaltige Peptide wurden durch Spezialfärbungen erkannt: Histidin mit p-Anisidin und Amylnitrit (24), Tyrosin mit α-Nitroso-β naphtol (25) und Tryptophan mit Ehrlich's Reagenz (p-Dimethylaminobenzaldehyd) (26).

Noch nicht reine Peptide wurden in den Systemen Pyridin/Eisessig/Wasser = 10 : 0,3 : 90 oder Ameisensäure/Eisessig/Wasser = 25 : 87 : 888 (27) durch Elektrophorese und/oder durch Chromatographie im Gemisch Chloroform/Methanol/Ammoniak = 2 : 2 : 1 (18) getrennt. Als Träger dienten mit Cellulose MN 300 (Machery, Nagel & Co.) oder Kieselgel-Stärke beschichtete Platten.

Quantitative Aminosäurebestimmung

Das angefärbte peptidhaltige Dünnschichtmaterial wurde ausgekratzt, auf eine Fritte gebracht und mit 5 - 7 ml

Methanol eluiert. Das Methanol wurde im Rotationsverdampfer vertrieben, der Rückstand in 0,1 ml 6n HCl gelöst und in Glasröhrchen eingeschmolzen. Bei der Hydrolyse zu erwartende Verluste an Methionin, Cystein und Tyrosin wurden durch Zusatz von 5 % Phenylhydrazin zur Salzsäure vermindert (28). Die Hydrolyse wurde in 20 - 24 Std. bei 105° C durchgeführt; die Hydrolysate wurden im Exsikkator über NaOH getrocknet. Die Aminosäuren wurden auf Cellulose-Platten (40 x 20 cm) durch Elektrophorese im System Ameisensäure/Eisessig/Wasser (29) pH 1,85 und mittels Chromatographie im System nButanol/Eisessig/Wasser = 4 : 1 : 1 (30) aufgetrennt und die Platten wie oben angegeben mit Ninhydrin besprüht.

Das so markierte aminosäurehaltige Material wurde aus der Schicht herausgekratzt und die Aminosäuren nach Quellenlassen in 1 ml Methanol mit etwa 5 ml Methanol eluiert.

Die quantitative Bestimmung der Aminosäuren erfolgte nach dem Verfahren von Lee (31) mit Ninhydrin-Glycerin-Citratpuffer.

Einige Peptide konnten später im automatischen Aminosäurenanalysator (BioCal BC 200, München) untersucht werden.

Analyse des Totalhydrolysats des Proteins

Je 3 mg Cytochrom c wurden mit 6n HCl 20 und 70 Std. lang bei 110° C in verschmolzenen Glasröhrchen hydrolysiert. Nach Entfernen der Salzsäure über NaOH-Plätzchen erfolgte die quantitative Bestimmung der Aminosäuren im automatischen Aminosäurenanalysator (Beckman, Unichrom, München und BioCal BC 200).

Sequenzbestimmung der Peptide

Nach der von Gray (32) modifizierten, von Edman (33) angegebenen Degradierungsmethode mit Phenylisothiocyanat konnte die Reihenfolge der Aminosäuren festgelegt werden. Die N-terminale Aminosäure des degradierten Peptids wurde

durch Markierung mit Dimethylamino-naphtalin-5-sulfonylchlorid (= DANS-Cl) (34) identifiziert. Die DANS-Aminosäuren lassen sich durch zweidimensionale Chromatographie in den Systemen Methylacetat/Isopropanol/Ammoniak = 9:7:4 (35) und Benzol/Pyridin/Eisessig = 80 : 20 : 2 (36) auf Kieselgel-G- (Merck, AG) -Dünnschichtplatten klar voneinander trennen.

Zur Differenzierung zwischen Asparaginsäure und Asparagin bzw. Glutaminsäure und Glutamin wurde das elektrophoretische Verhalten der einzelnen Peptide herangezogen (37). Bei bekanntem Aminosäuregehalt eines Peptids läßt seine Wanderstrecke eine Aussage über seine Ladung zu. Vergleichbare Werte werden erhalten, wenn man die Wanderstrecke von freiem Lysin als Bezugswert nimmt.

Die Abspaltung des Haems von Haemopeptid erfolgte in der von Ambler (38) angegebenen Weise durch Behandlung mit Quecksilberchlorid und Ameisensäure.

ERGEBNISSE

Aus je 1000 Herzen wurden ca. 30 mg Cytochrom c gewonnen. Der Eisengehalt betrug 0,44 %. Das Spektrum des Karpfencytochroms c zeigte die charakteristische Verlaufsform für Cytochrom-c-Moleküle (39). Für den Quotienten $E_{550\ red}/E_{280\ ox}$ errechnete sich ein Wert von 1,06-1,09.

Bei der Elektrophorese in Polyacrylamidgel (Na-Phosphat-Puffer, 0,065 M, pH 6,8) zeigten sich zwei rote cytochrom-c-haltige Zonen. Nach Färbung mit Amidoschwarz konnte kein weiteres Protein im Gelbett entdeckt werden. Das gleiche Ergebnis brachte ein Lauf im Na-Phosphatpuffer bei pH 6,4 und 5,8.

Die beiden Zonen wurden nach Einwandern in Sephadex G 50 aus dem Gel eluiert und tryptisch gespalten. Die Hydrolysate lieferten im Fingerprint-Verfahren identische Peptidmuster. Auch bei Zusatz von 4 M Harnstoff zum Poly-

acrylamidgel, wodurch Cytochrom c depolymerisiert wird (12), traten diese beiden Zonen in der Elektrophorese auf. Durch ihr im Gel gemessenes Absorptionsspektrum konnte die schneller zur Kathode wandernde Zone als oxydiertes Cytochrom c, die langsamere Zone dagegen als reduziertes Cytochrom c identifiziert werden. Eine Auftrennung in diese Fraktionen wurde auch von Flatmark bei der Disc-elektrophorese erhalten (40).

Beide Zonen strebten nach Beenden des elektrophoretischen Laufes schnell wieder einem Redoxgleichgewicht zu, was an der Änderung des Spektrums leicht erkennbar war. Eine zweite Elektrophorese jeder dieser voneinander getrennten Zonen lieferte wiederum jeweils 2 Zonen, die sich in ihrer Wandergeschwindigkeit von den Zonen der ersten Elektrophorese nicht unterschieden. Offensichtlich besitzen die beiden Redoxformen des Cytochroms c unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit. Die Auftrennung des Karpfencytochroms in 2 Banden ist demnach nicht auf das Vorhandensein von 2 Cytochromen unterschiedlicher Aminosäurestruktur (Isocytochrome) (41) zurückzuführen.

Die erhaltenen Werte der Totalhydrolyse des Cytochroms c sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Die Peptidmuster, die das angegebene Fingerprint-Verfahren lieferte, sind in den Abb. 1 und 2 dargestellt. Die mit Ninhydrin stark angefärbten Peptide sind durch ausgezogene Linien markiert; schwach angefärbte und nicht weiter analysierte Peptide sind punktiert.

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der Totalhydrolysate der einzelnen Peptide aufgeführt. Ihre Numerierung entspricht derjenigen der Fingerprints. Leucin und Isoleucin werden zusammen aufgeführt, da sie sich auf den Dünnschichtplatten nicht voneinander trennen ließen.

Die Bestimmung des C-terminalen Endes des Moleküls führte zu folgendem Ergebnis: Carboxypeptidase A setzte bei der Spaltung nach 2,5 Std. Serin frei, nach 4 Std. trat Threonin hinzu. Nach 9 Std. wurde der Versuch abgebrochen, da eine sichere Aussage über die weiterhin abge-

Tabelle 1

Aminosäurezusammensetzung des Karpfencytochroms c

Aminosäure	Mittelwert der 20 Std. Hydrolysate	Mittelwert der 70 Std. Hydrolysate	Mittelwert oder extrapolierter Wert	Betrag aus der Peptidanalyse
	Aminosäurereste pro Molekül			
Lysin	16,79	17,15	16,97	17
Histidin	1,7	2,0	1,85	2
Arginin	2,0	2,0	2,0	2
Asparaginsäure	8,25	7,7	7,97	8
Threonin	5,5	4,75	5,8 a)	6
Serin	4,47	3,45	4,9 a)	5
Glutaminsäure	10,51	10,1	10,3	10
Prolin	3,97	3,05	3,51	4
Glycin	12,02	12,25	12,13	12
Alanin	6,81	6,87	6,84	7
Cystein	0,92	0,72	0,82 b)	2
Valin	4,88	5,55	5,21	5
Methionin	1,9	1,82	1,86	2
Isoleucin	4,49	4,33	4,51	5
Leucin	6,29	5,67	5,98	6
Tyrosin	3,52	3,67	3,6	4
Phenylalanin	3,6	3,65	3,63	4
Tryptophan	-	-	2,0 d)	2 c)
gesamt				103

a) der Wert errechnet sich aus der linearen Extrapolation zur Hydrolysezeit 0 Std.

b) Cystein wird während der Säurehydrolyse durch Oxydation weitgehend zerstört.

c) dieser Wert wurde aus der Färbung der Peptide mit Ehrlich's Reagenz ermittelt.

d) aufgrund des Absorptionsverhältnisses bei den Wellenlängen 280 und 550 nm angenommen.

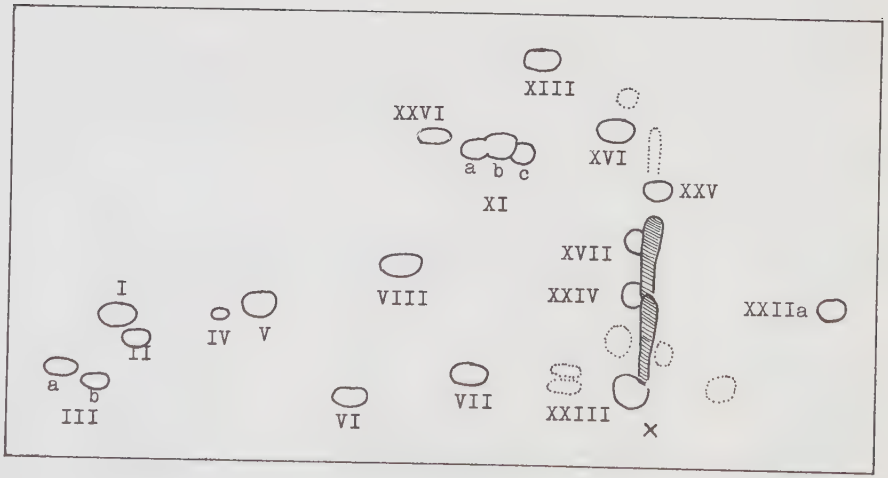

Abb.1. Fingerprintmuster der Peptide nach tryptischer Spaltung des Karpfencytochroms c. Dünnschichtplatten (Kieselgel-Stärke). 1.Dimension (horizontal) Elektrophorese bei pH 5,8, Anode rechts. 2. Dimension (vertikal) Chromatographie, dreimal aufsteigend. Das Kreuz zeigt die Startstelle an. Das durch seine rote Eigenfarbe hervortretende Haemopeptid ist schraffiert. Mit Ninhydrin schwach gefärbte und nicht weiter analysierte Peptide sind punktiert.

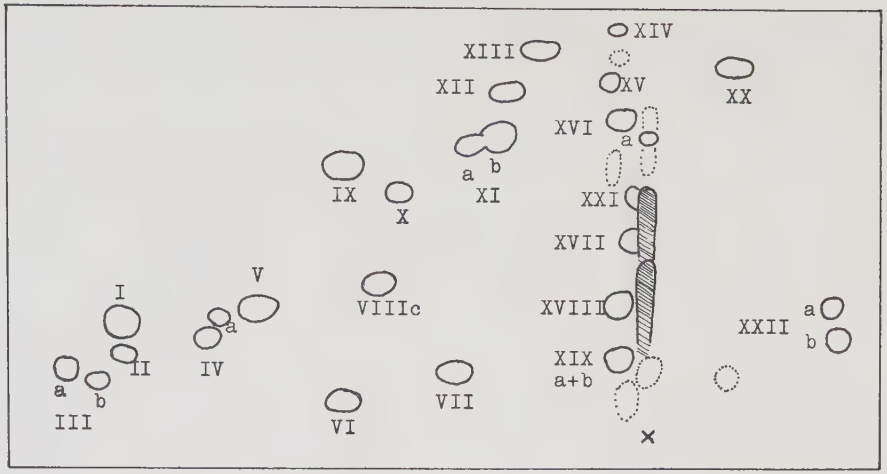

Abb.2. Fingerprintmuster der Peptide nach Spaltung des Cytochroms c des Karpfens mit einem Trypsinpräparat, das noch chymotryptische Aktivität besaß. Elektrophorese bei pH 6,o. Die gegenüber Abb.1 unterschiedliche Lage der am weitesten zur Kathode wandernden Peptide beruht auf der pH-Differenz der verwendeten Puffer. Weitere Erläuterungen siehe Abb.1.

Tabelle 2

Aminosäurezusammensetzung der Peptide:

Die Peptide sind nach den Nummern auf den finger-prints (Abb. 1 und 2) aufgeführt.

	I	II	IIIa	IIIb	IV	IVa	V	VI	VII	VIII	VIIIc	IX	X	XIa	XIb	XIc	XII	XIII
Lysin	1	1	1	2	1	-	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	-	1
Histidin	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginin	-	-	-	-	-	1	-	1	1	-	-	-	-	-	-	1	1	-
Asparaginsäure	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
Threonin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-
Serin	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glutaminsäure	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1	-	-	1	-	-	-	-
Prolin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	1	-	-
Glycin	-	-	-	1	1	1	-	1	1	1	-	-	1	-	1	3	2	-
Alanin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
Cystein	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Valin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	1	-	-
Methionin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Iso/Leucin *	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1	1	1	2	1	2
Tyrosin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-
Phenylalanin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1	1
Tryptophan **	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-

*) Isoleucin und Leucin werden zusammen aufgeführt, da sie in dem verwendeten Verfahren nicht getrennt werden konnten (näheres siehe Text).

**) Tryptophan wurde aus der Färbung mit Ehrlich's Reagenz bestimmt.

Tabelle 2 (Fortsetzung)

	XIV	XV	XVI	XVIa	XVII	XVIII	XIXa	XIXb	XX	XXI	XXIIa	XXIIb	XXIII	XXIV	XXV	XXVI	Haemo-peptid
Lysin	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1	-	1	1	1	2	1
Histidin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Arginin	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Asparaginsäure	-	-	1	-	-	1	-	2	1	1	1	1	2	2	1	-	1
Threonin	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	2	1	-	-	-
Serin	-	-	-	1	2	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-
Glutaminsäure	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	1	-	1	4	-	-	2
Prolin	-	1	1	-	-	1	-	-	-	1	-	-	1	1	-	-	-
Glycin	-	1	3	1	-	1	1	-	-	-	1	1	2	-	-	1	1
Alanin	-	-	-	-	1	-	-	1	2	-	-	-	2	-	2	1	1
Cystein	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Valin	-	1	1	1	-	1	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	1
Methionin	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-
Iso/Leucin *	1	-	2	-	-	1	-	-	2	4	-	-	-	2	3	2	-
Tyrosin	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	1	1	1	-	-
Phenylalanin	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-
Tryptophan **	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

spaltenen Aminosäuren nicht mehr möglich war. Damit ergibt sich als Sequenz Thr-Ser-COOH.

Für die einzelnen Peptide konnten folgende Sequenzen bestimmt werden:

Peptid I : ergibt bei Cochromatographie mit freiem Lysin eine Verstärkung des Fleckes.

Peptid II : als N-terminale Aminosäure wurde Histidin gefunden. Da das Totalhydrolysat Histidin und Lysin in gleichen Mengen enthält, handelt es sich um His-Lys.

Peptid IIIa: nach Behandlung mit DANS-Cl wird nur Lysin erhalten. Aufgrund seiner elektrophoretischen Wanderung und seines chromatographischen Verhaltens muß es sich um das Dipeptid Lys-Lys handeln.

Peptid IIIb: N-terminal findet sich Glycin, aus dem Ergebnis des Totalhydrolysates (Tab. 2) läßt sich die Sequenz Gly-Lys-Lys aufstellen.

Peptid IV : es ist ein Teilpeptid von IIIb, Glycin steht N-terminal. Sequenz: Gly-Lys

Peptid V : als N-terminale Aminosäure wird Serin erhalten. Da Lysin in gleichem molaren Verhältnis vorhanden ist, lautet die Sequenz Ser--Lys.

Peptid VI : es ergibt nach der Degradation Lys, Lys, Gly, Glu und Arg nacheinander. Da es trotz seiner 3 basischen Aminosäuren in der Elektrophorese langsam zur Kathode wandert, muß die Glutaminsäure als Säure vorliegen (37). Sequenz: Lys-Lys-Gly-Glu-Arg. Peptid VII ist ein Spaltprodukt von VI.

Peptid VIII :es enthält ein Lysin mehr als Peptid XIb, dessen Sequenz mit Tyr-Ile-Pro-Gly-Thr-Lys analysiert werden konnte.

Peptid IX: N-terminal steht Leucin; seine Sequenz ist damit Leu-Lys.

Peptid XIa: seine Sequenz ergibt sich mit Ile-Phe-Val-$GluNH_2$-Lys. Aufgrund der elektrophoretischen Wanderung muß die Glutaminsäure als Amid vorliegen.

Peptid XIc: es enthält ein Lysin mehr als Peptid XVI, dessen Sequenz mit Val-Gly-Pro-$AspNH_2$-Leu--Trp-Gly-Leu-Phe-Gly-Arg analysiert werden konnte. Die elektrophoretische Wanderung von Peptid XVIII ergibt, daß die Asparaginsäure als Amid vorliegt. Weitere Teilpeptide sind XII, XV und IVa.

Peptid XIII: Sequenz: Met-Ile-Phe-Ala-Gly-Ile-Lys, Teilpeptide sind X und XIVa.

Peptid XVII: Sequenz: Ser-Ala-Thr-Ser. Da dieses Peptid auch nach rein tryptischer Spaltung auftritt und die sonst nicht auftretende Sequenz Thr-Ser durch die Carboxypeptidasespaltung erhalten wird, muß es sich um das C-terminale Peptid handeln.

Peptid XX: Sequenz: Ala-Asp-Leu-Ile-Ala-Tyr. Es wandert in der Elektrophorese zur Anode, weswegen Asparaginsäure als Säure vorliegen muß. Mit Peptid IX zusammen bildet es Peptid XXV.

Peptid XXIIa: es läßt sich mit Phenylisothiocyanat weder degradieren, noch mit DANS-Cl markieren. Nach partieller HCl-Hydrolyse (27) ergeben sich durch die elektrophoretische Auftrennung in Ameisensäure/Eisessig/Wasser zwei Komponenten, wovon die startnäher liegende die Sequenz Asp-Val-Glu-Lys zeigt. Da das Totalhydrolysat diese Aminosäuren und Gly ergibt, und Peptid XXIIb, das sich gleichfalls nicht degradieren und markieren läßt, Asp, Gly, Val enthält, ergibt sich als Sequenz: Gly-Asp-Val-Glu-Lys.

Haemopeptide: die Degradation der vom Haem befreiten Peptidkette ergab nacheinander die Aminosäuren Cys, Ala, Glu, Cys und His. Eine weitere Degradierung konnte wegen Materialmangels nicht durchgeführt werden. Die chymotryptische Spaltung lieferte mehrere Peptide, von denen das am weitesten zur Kathode wandernde als Gly-Lys analysiert werden konnte. Da Chymotrypsin nicht vor oder nach Glycin spaltet, macht es den vermuteten Aminosäureaustausch eines Glycin gegen Lysin wahrscheinlich. Hierfür spricht auch das Auftreten von zwei chromatographisch trennbaren Haemopeptiden.

Das Restpeptid mit dem Haem wanderte in der Elektrophorese nicht, was für das Vorliegen der Glutaminsäure als Amid sprechen würde.
Sequenz: Cys-Ala-Glx-Cys-His- [Thr, Val, Glx, Asx, Gly, Lys] .

Die Reihenfolge der einzelnen in ihrer Aminosäuresequenz aufgeklärten Peptide läßt sich durch Vergleich mit den bereits bekannten Aminosäuresequenzen anderer Cytochrome aufstellen. Dies ist ein bei der Aufklärung der Primärstruktur von Cytochrom c geübtes Verfahren (Goldstone und Smith (10), Stevens, Glazer und Smith (27), Narita und Titani (42)). Überdies wird die Anordnung der einzelnen Peptide in der Gesamtsequenz des Proteins durch überlappende Peptide, die infolge der schwachen chymotryptischen Aktivität bei der tryptischen Spaltung erhalten wurden (siehe Abb. 2) erleichtert. Hiermit kann die Struktur des Cytochroms c des Karpfens aufgestellt werden, (Abb. 3).

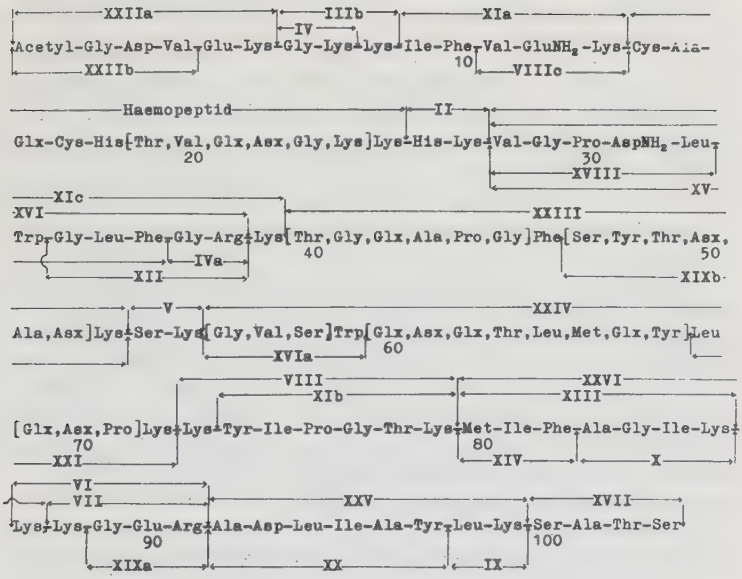

Abb. 3 Struktur des Moleküls von Cytochrom c des Karpfens. Über der Proteinkette stehen die Nummern der tryptischen Peptide aus Abb. 1, darunter die chymotryptischen Spaltprodukte aus Abb. 2. Weitere Erläuterungen im Text.

DISKUSSION

Der für das Karpfencytochrom c errechnete Extinktionsquotient $E_{550\ red}/E_{280\ ox}$ = 1,06 - 1,09 ist mit dem der beiden anderen Fische: Lachs = 1,00 (7) und Thunfisch = 1,04 - 1,06 (5) gut vergleichbar. Beim Pferd liegt dieser Quotient bei 1,25 (39, 43), beim Haifisch bei 1,22 (10). Ursache hierfür ist der geringere Gehalt an aromatischen Aminosäuren im Molekül dieser beider Cytochrome (39), der bei gleicher Proteinkonzentration zu einer Erhöhung der Extinktion bei der Wellenlänge 280 nm führt.

Von den bei der enzymatischen Spaltung entstehenden Peptiden konnten 36 analysiert werden. Die Fingerprintmuster sind mit denen gut vergleichbar, die Tuppy für das Pferdecytochrom c (37) und Kreil für das Thunfischcytochrom c (11) beschrieben haben, obwohl zur Trennung der Peptide die Elektrophorese bei einem anderen pH-Wert ausgeführt und die Chromatographie durch die Wahl der Dünnschichtplatten modifiziert wurde.

Da das hier angegebene dünnschichtchromatographische Verfahren zur Trennung der Aminosäuren es nicht gestattet, Leucin und Isoleucin voneinander zu trennen, wurde zu ihrer Unterscheidung entweder der Aminosäurenanalysator oder die Markierung mit DANS-Cl herangezogen. Die DANS-Aminosäuren lassen sich klar voneinander trennen.

Der Anfang der Proteinkette ist noch nicht vollkommen aufgeklärt. Peptid XXIIa ist mit größter Wahrscheinlichkeit das bei den Wirbeltieren auftretende N-terminale Acetylpeptid des Cytochroms c. Es bleibt unklar, warum es im Fingerprintmuster mit Ninhydrin anfärbbar war, da eine freie NH_2-Gruppe der N-terminalen Aminosäure als Phenylhydantoin- (33) oder DANS-Aminosäure (34) nicht bestimmt werden konnte. Auch beim Cytochrom c des Pferdes +), das erwiesenermaßen ein N-terminales Acetylpeptid enthält (37, 43), gelang es, nach tryptischer

---

+) Präparat der Firma Boehringer, Mannheim

Spaltung im Fingerprint unter denselben Bedingungen eine positive Ninhydrinreaktion für das entsprechende N-terminale Acetylpeptid zu erhalten. Die Bindung des Acetylrestes an die Aminogruppe des Glycins scheint nicht allzu fest zu sein (11, 37, 43).

Soweit bekannt, stimmen die Haemopeptide von Position 14 bis Position 21 von Lachs (44), Thunfisch (11) und Haifisch (10) überein. Es ist anzunehmen, daß auch der Karpfen in diesem Bereich die gleiche Struktur besitzt.

Da das Cytochrom c des Thunfisches aus 103 Aminosäuren besteht, das Cytochrom c des Haifisches aber aus 104 Aminosäuren, lassen sich die Totalhydrolysate nur mit Einschränkung miteinander vergleichen. Im Totalhydrolysat zeigen die beiden Fische 7 unterschiedliche Aminosäuren, bei Vergleich der Sequenz der beiden Proteine dagegen 17 bzw. 19 (10), wobei die letzte Zahl davon abhängig ist, ob die Deletion einer Aminosäure beim Thunfisch in Position 100 oder 104 angenommen wird.

Haifisch und Karpfen zeigen 7, Thunfisch und Karpfen 6 unterschiedliche Aminosäuren im Totalhydrolysat.

Ein Vergleich der bis jetzt ermittelten Sequenz von Karpfencytochrom c gestattet die Aussage, daß sich auch hier gleiche Aminosäuren in denjenigen Positionen des Moleküls befinden, die die Cytochrome der Fische von anderen Wirbeltiercytochromen unterscheiden: C-terminal und in Position 54 Serin, in Position 22 vermutlich ebenfalls Asparagin und in Position 61 Glutamin (Haifisch) oder Asparagin (Thunfisch). Cytochrom c von Thunfisch und Karpfen haben Valin in Position 28, Tryptophan in 33, Isoleucin in 85, Glycin in Position 89, sowie das C-terminale Ende gemeinsam. Haifisch und Karpfen stimmen in Position 4 (Glutaminsäure) und 95 (Isoleucin) überein.

Für die Annahme von nur 103 Aminosäuren auch beim Cytochrom c des Karpfens gegenüber 104 beim Haifisch und den übrigen Wirbeltieren spricht, daß kein Peptid Leu-Lys-Lys oder Lys-Ser-Ala-Thr-Ser gefunden werden

konnte. Überdies ergibt die Summe der Aminosäuren im Totalhydrolysat nur 103 Aminosäuren.

Es bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten, zu entscheiden, durch welche Positionsunterschiede in der Aminosäure-Sequenz das Cytochrom c der Fische von dem anderer Spezies abweicht.

Zusammenfassung

Aus 9800 Herzen des Speisekarpfens (Cyprinus carpio) wurden 300 mg Cytochrom c isoliert und durch Ionenaustauschchromatographie, Gelfiltration und Ammoniumsulfatfällung gereinigt. Die Reinheit des Haemoproteids wurde durch Messung des Absorptionsspektrums, durch Bestimmung des Eisengehaltes und durch Elektrophorese in Polyacrylamidgel geprüft.

Zur Ermittlung der Aminosäurenzusammensetzung wurde das Protein der vollständigen Säurehydrolyse unterworfen und die Aminosäuren mit Hilfe eines Aminosäurenanalysators quantitativ bestimmt.

Zur Bestimmung der Reihenfolge der Aminosäuren in der Polypeptidkette wurde das Cytochrom c enzymatisch mit Trypsin gespalten und die entstandenen Peptide durch Elektrophorese und Chromatographie auf Dünnschichtplatten voneinander getrennt. Von 36 Peptiden wurde die Aminosäure-Zusammensetzung quantitativ bestimmt. Bei 16 Peptiden wurde die Sequenz der Aminosäuren durch stufenweisen EDMAN-Abbau und durch Markierung der Aminosäuren mit Dimethylamino-naphtalin-5-sulfonylchlorid ermittelt. Auf diese Weise konnten 64 % der insgesamt 103 Aminosäuren umfassenden Sequenz des Karpfencytochroms aufgestellt werden.

Die Struktur dieses Haemoproteids wurde mit der bereits bekannten Sequenz des Cytochroms c von Thunfisch und Haifisch verglichen. Dabei ergab sich, daß das Cytochrom c des Karpfens eine über die allgemeine für Wirbeltiere charakteristische Struktur hinausgehende Ähnlichkeit mit dem Cytochrom c der beiden anderen Fische besitzt.

Literatur

1) Nolan, C. und Margoliash, E. in P.D.Boyer, Annual Review of Biochemistry, Band 37, S. 727-743, Palo Alto, Californien (1968).
2) MacMunn, C.A., J.Physiol. (London) 8, 51 (1887).
3) Margoliash, E. und Smith, E.L., Nature 192, 1121 (1961)
4) Kreil, G. und Tuppy, H., Nature 192, 1123 (1961).
5) Margoliash, E. und Schejter, A. in C.B. Anfinsen, M.L.Anson, J.T.Edsall und F.M.Richards, Advances in Protein Chemistry, Band 21, S. 113 - 286, Academic Press, New York (1966).
6) Margoliash, E. und Smith, E.L. in V.Bryson und H.J. Vogel, Evolving Genes and Proteins, S. 221-242, Academic Press, New York (1965).
7) Paléus, S., Acta Chem.Scand. 8, 971 (1954).
8) Hagihara, B., Tagowa, K., Nozaki, M., Morikawa, I., Yamashito, J. und Okunuki, K., Nature 179, 249 (1957).
9) Margoliash, E. und Walasek, O. in S.P.Colowick und N.O.Kaplan, Methods in Enzymology, Band 10, 343, Academic Press, New York (1967).
10) Goldstone, A. und Smith, E.L., J.Biol.Chem. 242, 4702 (1967).
11) Kreil, G., Hoppe-Seylers Z.Physiol.Chem. 334, 154 (1963).
12) Flatmark, T., Acta Chem.Scand. 18, 1517 (1964).
13) Hagihara, B., Morikawa, I., Tagowa, K. und Okunuki, K., Biochem. Preparations 6, 4 (1958).
14) Lorber, L., Biochem. Z. 181, 391 (1927).
15) Paul, K.G., Acta Chem.Scand. 2, 434 (1948).
16) Bloemendal, H., Zone Electrophoresis in Blocks and Columns, S. 64, Elsevier-Publishing-Company, Amsterdam (1963).
17) Wieland, T. und Georgopoulos, D., Biochem. Z. 340, 480 (1964).

18) Anfinsen, C., J.Biol.Chem. 234, 1118 (1959).
19) Redfield, R. und Anfinsen, C., J.Biol.Chem. 221, 386 (1956).
20) Matsubara, H. und Smith, E.L., J.Biol.Chem. 238, 2732 (1963).
21) Fraenkel-Conrat, H., Harris, J. und Levy, A. in D. Glick, Methods of Biochemical Analysis, Band 2, 359-425, Interscience, New York (1955).
22) Barrolier, J., Naturwissenschaften 48, 404 (1961).
23) Lieb, H. und Schöninger, W., in K.Lang, E.Lehnartz und G.Siebert, Handbuch der physiol. und pathol. chem. Analyse, Band III, S. 323, Springer Verlag, Berlin (1955).
24) Sanger, F. und Tuppy, H., Biochem.J. 49, 463 (1951).
25) Acher, R. und Coocker, C., Biochim, Biophys. Acta 9, 704 (1952).
26) Smith, I., Nature 171, 43 (1953).
27) Stevens, C., Glazer, A. und Smith, E.L., J.Biol.Chem. 242, 2766 (1967).
28) Nakajama, S., Chem. Abstracts 52, 4724 (1958).
Watsuji, S., Chem. Abstracts 52, 3005 (1958).
zitiert in P. Alexander und R.J. Bock, Analytical Methods of Protein Chemistry, Band 2, S. 7 (Fußnote), Pergamon Press, Oxford (1960).
29) Atfield, G. und Morris, C., Biochem. J. 81, 606 (1961).
30) Brenner, M. und Niederwieser, A., Experientia (Basel) 16, 378 (1960).
31) Lee, Y.P. und Takahashi, T., Analy.Biochemistry 14, 71 (1966).
32) Gray, W.R. in S.P. Colowick und N.O.Kaplan, Methods in Enzymology, Band 11, S. 469-475, Academic Press, New York (1967).
33) Edman, P., Acta Chem.Scand. 10, 761 (1956).
34) Gray, W.R. und Hartley, B., Biochem.J. 89, 59 P (1963).

35) Schmer, G., Hoppe-Seylers Z.Physiol.Chem. 349, 200 (1967).
36) Morse, D. und Horecker, B., Analyt.Biochemistry 14, 429 (1966).
37) Tuppy, H. und Kreil, G., Mhft.f.Chemie 93, 780 (1962).
38) Ambler, R.P., Biochem.J. 89, 349 (1963).
39) Margoliash, E. und Frohwirt, N., Biochem.J. 71, 570 (1957).
40) Flatmark, T., Acta Chem.Scand. 20, 1481 (1966).
41) Slonimski, P.P., Acher, R., Péré, G., Sels, A. und Somlo, M. in MJ-C. Senez, International Symposium on Mechanism of Regulation of Cellular Activities in Microorganismus, Marseilles, S. 435, Centre National de la Recherche Scientifique, Paris (1965).
42) Narita, K. und Titani, K., J.Biochem. 63, 226 (1968).
43) Margolish, E. und Smith, E.L., J.Biol.Chem. 237, 2151 (1962).
44) Šorm, F. in F.F.Nord, Advances in Enzymology, Band 24, 418, Interscience, New York (1962).

L e b e n s l a u f

Am 26.4.1942 wurde ich, Lutz Gürtler, als Sohn des Referenten Dr. Heinz Gürtler und seiner Ehefrau Margret, geb. Stodiek in Bielefeld geboren.

Die Volksschule besuchte ich in Bokel bei Halle in Westfalen, in Siegen und Erlangen-Bruck. 1952 besuchte ich das Realgymnasium in Erlangen, ab 1959 das in Uffenheim/Mfr., wo ich 1962 das Abitur bestand.

In Erlangen begann ich 1962 mit dem Medizinstudium; dort legte ich 1963 das Vorphysikum, 1965 das Physikum und 1968 das med. Staatsexamen ab.

Seit Oktober 1965 arbeite ich im Physiologisch-chemischen Institut unter der Leitung von Herrn Doz. Dr. H-J. Horstmann an meiner Dissertationsarbeit. Im April 1968 veröffentlichte ich zusammen mit Dr. Horstmann eine wissenschaftliche Arbeit über Ribosomen-Proteine (Hoppe-Seyler Z.Physiol.Chem. 349, 410-416). Seit August 1968 arbeite ich im Physiologisch-chemischen Institut als Medizinalassistent.

Herrn Professor Dr. Dr. F. May bin ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes zu hohem Dank verpflichtet.

Danken möchte ich Herrn Doz. Dr. H-J. Horstmann sehr herzlich für die wissenschaftliche Anleitung, die anregenden Hinweise und die äußerst wertvollen Diskussionen.

Herrn Oberarzt Doz. Dr. J. Wollensak von der Universitätsaugenklinik Erlangen möchte ich für die großzügige Hilfe bei der Ausführung der Analyse der Totalhydrolysate im Beckman-Aminosäurenanalysator danken.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990